

NGHIÊN CỨU XÁC ĐỊNH ĐỒNG THỜI MỘT SỐ CHẤT MÀU TRỘN TRÁI PHÉP TRONG THỰC PHẨM BẰNG SẮC KÝ LỎNG KHỐI PHỔ HAI LẦN

Vũ Lan Phương^{1*}, Nguyễn Thị Hà Bình², Doãn Thu Huyền¹
Lê Thị Kim Vân³, Trần Cao Sơn², Lê Thị Hồng Hảo²

¹Trường Đại học Dược Hà Nội

²Viện Kiểm nghiệm an toàn vệ sinh thực phẩm Quốc Gia

³Viện Dược liệu

(Ngày đến tòa soạn: 10/02/2020; Ngày sửa bài sau phản biện: 07/03/2020; Ngày chấp nhận đăng: 18/03/2020)

Tóm tắt

Kỹ thuật sắc ký lỏng khối phổ ba tứ cực (LC-MS/MS) với nguồn ion hóa phun điện tử dương (ESI+), chế độ theo dõi đa phản ứng (MRM) đã được sử dụng để phát hiện và định lượng đồng thời 16 chất màu trộn trái phép trong các nhóm thực phẩm khác nhau. Phương pháp dựa trên cơ sở chiết các chất màu ra khỏi nền mẫu bằng kỹ thuật QuEChERS. Dịch chiết sau khi làm sạch qua d-SPE với hỗn hợp MgSO₄, PSA và C18 sẽ được phân tích trên thiết bị LC-MS/MS. Mỗi chất màu được đặc trưng bởi 1 ion mẹ và 2 ion con. Phương pháp cho phép sàng lọc sự có mặt đồng thời của 16 chất màu ở mức nồng độ tối thiểu là 5 µg/kg với rhodamin B, crystal violet, chrysoidin G, auramin O, sudan black B, pararosanilin và 50 µg/kg với oil orange SS, canthaxanthin, malachite green, leucomalachite green, sudan I, sudan II, sudan III, sudan IV, sudan red B, para red. Độ đặc hiệu đạt yêu cầu theo EC 657/2002, khoảng tuyến tính từ 1 - 1000 µg/L, độ thu hồi từ 73 - 104%, độ lặp lại tốt với RSD % thấp hơn 16,4%. Phương pháp đã được áp dụng để phân tích 30 mẫu thịt bò khô, thịt gà khô, tương ớt, ớt bột, chất phụ gia tạo màu. Kết quả phân tích đã phát hiện 02 mẫu ớt bột và 04 mẫu phụ gia tạo màu có chứa rhodamin B, sudan I và auramin O.

Từ khóa: LC-MS/MS, chất màu, trộn trái phép, thực phẩm, thịt bò khô, thịt gà khô, tương ớt.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Theo xu hướng phát triển của ngành công nghiệp thực phẩm thì việc sử dụng phẩm màu thực phẩm ngày càng phổ biến và được ứng dụng rộng rãi. Tuy nhiên, việc sử dụng phẩm màu đang bị lạm dụng, đặc biệt là việc dùng các phẩm màu không nằm trong danh mục được phép sử dụng trong thực phẩm nhờ những ưu điểm về đa dạng màu sắc, dễ mua, dễ sử dụng, bền màu và hiệu quả kinh tế cao. Thông tư 24/2019/TT-BYT quy định về quản lý và sử dụng phụ gia thực phẩm với 57 phẩm màu được phép sử dụng trong thực phẩm. Việc sử dụng các loại phẩm màu thực phẩm không nằm trong danh mục cho phép của Bộ Y tế có thể gây ra những ảnh hưởng xấu đến sức khỏe người sử dụng. Nếu cơ thể hấp thụ lâu ngày các chất màu có thể được tích tụ lại và gây ra các bệnh mãn tính, ung thư [1].

Trên thế giới đã ghi nhận một số sự vụ liên quan đến việc sử dụng các chất màu trộn trái phép trong thực phẩm. Năm 2006 tại Trung Quốc phát hiện dư lượng sudan IV trong trứng, hàm lượng sudan IV được phát hiện ở gà mái, gà và trứng lên tới 300 µg/kg [2]. Tại Việt Nam, vấn đề sử dụng phẩm màu trộn trái phép trong thực phẩm cũng rất đáng quan ngại. Năm 2007, thành phố Hồ Chí Minh phát hiện mẫu trứng tại một số chợ truyền thống chứa sudan với tỷ lệ khoảng 50%. Một số báo cáo khác cũng phát hiện chất màu rhodamin B trong một loạt các sản phẩm hạt dưa, ớt bột, chất màu auramin O trong măng tươi và măng khô, các chất malachite green và leucomalachite green trong bánh cốm [3].

* Điện thoại: 0983102104 Email: vulanphuongkd@gmail.com

Hiện nay, có một số phương pháp thường được sử dụng để xác định chất màu như HPLC-UV, HPLC-FLD và LC-MS/MS. Phương pháp HPLC với detector UV-VIS được Xiran He và cộng sự [4] sử dụng để phân tích các chất sudan trong thực phẩm. Giới hạn phát hiện có thể đạt được khoảng 1,5 µg/kg nhưng tính đặc hiệu không tốt trên các nền mẫu phức tạp và chỉ áp dụng cho một vài chất màu cùng nhóm. Kỹ thuật LC-MS/MS đang được sử dụng để xác định đồng thời các chất màu trộn trái phép trong thực phẩm do tính đặc hiệu và độ nhạy tốt, thiết bị khối phổ ba tứ cực được nhiều tác giả sử dụng. Li và cộng sự [5] xác định đồng thời 08 chất màu trộn trái phép trong ớt với LOD khoảng 0,05 µg/kg, độ thu hồi từ 70 - 119%. Feng và cộng sự [6] xác định đồng thời 40 phẩm màu trộn sử dụng trái phép trong mẫu nước giải khát với LOD từ 0,125 mg/L, hiệu suất thu hồi từ 91 - 105%. Liu và cộng sự [7] xác định đồng thời 15 phẩm màu trộn trái phép trong thức ăn chăn nuôi với độ thu hồi trong khoảng 60 - 140% và LOD từ 0,01 - 5,61 µg/kg. Ngoài ra, một số nghiên cứu sử dụng thiết bị sắc ký lỏng khối phổ phân giải cao để sàng lọc các chất màu [8-10]. Nhược điểm của phương pháp này là thiết bị đắt tiền nên chưa phổ biến. Tại Việt Nam, đã có một số tiêu chuẩn để xác định các chất màu, nhưng chưa có phương pháp chính thức để xác định đồng thời nhiều chất màu trộn trái phép trong thực phẩm.

Trong báo cáo này, 16 chất màu không nằm trong danh mục được phép sử dụng trong thực phẩm bao gồm malachite green, leucomalachite green, chrysodine G, rhodamine B, auramin O, sudan I, sudan II, sudan III, sudan IV, sudan red B, sudan black B, para red, oil orange SS, pararosanilin, crystal violet, canthaxanthin đã được khảo sát để xây dựng và thẩm định phương pháp, đồng thời sơ bộ xác định hàm lượng các chất màu này trong các mẫu thực phẩm được lấy tại Hà Nội.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu và hóa chất

Các chất chuẩn malachite green, leucomalachite green, chrysodine G, rhodamine B, auramin O, sudan I, sudan II, sudan III, sudan IV, sudan red B, sudan black B, para red, oil orange SS, pararosanilin, crystal violet, canthaxanthin được mua từ hãng Sigma Aldrich. Acetonitril và acid formic loại dùng cho LC-MS và các dung môi, hóa chất tinh khiết phân tích gồm methanol, ethanol, amoni acetate của Merck. Bột làm sạch gồm có C18, PSA, GCB của Agilent (Hoa Kỳ), cột HLB (60 mg/3 ml) của Waters và cột Alumina-N phase (500 mg/3 ml) của Phenomenex.

Đối tượng mẫu nghiên cứu gồm 50 mẫu thịt bò khô, gà khô, tương ớt, ớt bột được lấy ngẫu nhiên trên thị trường Hà Nội.

2.2. Thiết bị

Hệ thống sắc ký lỏng khối phổ hai lần gồm sắc ký lỏng siêu hiệu năng (U-HPLC) gồm: LC 1295, khối phổ ba tứ cực QQQ 6460 (Agilent, Hoa Kỳ) và các thiết bị thông thường của phòng thí nghiệm gồm cân phân tích (độ chính xác 0,1 mg), máy lắc xoay, máy ly tâm (tốc độ tối đa 18000 vòng/phút), thiết bị đồng nhất mẫu.

2.3. Phương pháp nghiên cứu

2.3.1. Tối ưu phương pháp

Các điều kiện phân mảnh ion mẹ để thu được các ion con và năng lượng va chạm được tối ưu tự động bằng cách tiêm trực tiếp các dung dịch chuẩn phẩm màu vào khối phổ với nguồn ion hóa ESI, chế độ ion dương. Sắc ký lỏng sử dụng cột C18, pha động gồm 2 kênh A và B tương ứng là acetonitril và acid formic 0,1% với các tỷ lệ khác nhau được khảo sát để tối ưu.

Điều kiện xử lý mẫu được tối ưu thông qua việc khảo sát một số quy trình xử lý mẫu sau:

Quy trình 1 [7]: Cân 2 g mẫu, thêm 10 mL ACN : H₂O (8 : 2), lắc vortex 1 phút, lắc ngang 30 phút. Ly tâm, lấy dịch qua cột Alumina-N phase (500 mg, 3 mL). Cột được hoạt hóa bằng 3 mL ACN. Nạp mẫu qua cột. Rửa giải chất phân tích bằng 3 mL MeOH : acid acetic (95 : 5). Lọc dịch qua màng, rồi phân tích bằng LC-MS/MS.

Quy trình 2 [6]: Cân 2 g mẫu, thêm 10 mL ACN : H₂O (8 : 2), lắc vortex 1 phút, lắc ngang 30 phút. Chỉnh pH về 3 - 3,5 bằng acid formic. Ly tâm, lấy dịch thêm 10 mL nước, lắc đều, cho dịch trộn qua cột HLB (60 mg, 3 mL). Cột được hoạt hóa bằng 5 mL MeOH, 5 mL nước. Rửa tạp bằng 5 ml MeOH : H₂O chứa acid formic 0,1% (15 : 85). Rửa giải chất phân tích bằng 2 mL H₂O : MeOH (9 : 1). Lọc dịch qua màng và phân tích bằng LC-MS/MS.

Quy trình 3 [4]: Cân 2 g mẫu, thêm 10 mL ACN : H₂O (8 : 2), lắc vortex 1 phút, lắc ngang 30 phút. Thêm 4 g MgSO₄, 1 g NaCl, lắc vortex 1 phút. Ly tâm, lọc dịch và phân tích bằng LC-MS/MS.

Sau khi lựa chọn được quy trình xử lý mẫu phù hợp, một số yếu tố ảnh hưởng đến quy trình đã được khảo sát tối ưu bao gồm: dung môi chiết, muối chiết và bước làm sạch.

2.4.2. Thẩm định phương pháp

Phương pháp được thẩm định tính đặc hiệu, giới hạn phát hiện, giới hạn định lượng, độ lặp lại, độ thu hồi theo hướng dẫn của AOAC.

3. KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

3.1. Xây dựng phương pháp

3.1.1. Khảo sát điều kiện khối phổ

Thiết bị khối phổ ba tứ cực với nguồn ion hóa phun điện tử, chế độ ion dương được sử dụng để khảo sát điều kiện lựa chọn ion mẹ và ion con tối ưu. Kết quả được trình bày trong bảng 1.

Bảng 1. Kết quả khảo sát điều kiện khối phổ và thời gian lưu, tỷ lệ ion của các chất phân tích

TT	Chất phân tích	Ion mẹ	Ion con	CE (eV)	Tỷ lệ ion (%)	Thời gian lưu (phút)
1	Oil orange SS	263,0	245*/203	20/20	5,0	14,1
2	Rhodamin B	443,5	399*/355	30/30	12,5	7,8
3	Canthaxanthin	565,0	203*/156	30/30	20	15,1
4	Crystal violet	372,3	356*/251	42/36	4,0	11,1
5	Malachite green	329,3	313*/208	49/38	70	9,4
6	Leucomalachite green	331,0	316/239*	35/45	20	14,2
7	Chrysoidin G	213,2	196/121*	20/20	8,5	7,9
8	Auramin O	268,3	147*/107	28/34	30	7,3
9	Sudan I	249,0	128/93*	26/25	60	12,4
10	Sudan II	277,0	121*/106	14/50	60	15
11	Sudan III	353,0	128/77*	38/30	60	16,6
12	Sudan IV	381,0	106/91*	42/30	40	14,7
13	Sudan red B	381,2	115*/106	42/42	10	14,6
14	Sudan black B	457,0	194*/142	35/20	2,5	16,4
15	Para red	294,1	156/128*	14/30	80	11,3
16	Pararosanilin	288,2	195*/151	30/58	14	5,6

* Ion định lượng

Các thông số phân tích khối phổ khác được tối ưu để thu được tín hiệu tốt nhất bao gồm:

Điện thế đầu phun: 4000 V; nhiệt độ đầu phun: 350°C; áp suất khí hỗ trợ là 30 psi.

Với các điều kiện khối phổ đã khảo sát, mỗi chất đều xác định được 02 mảnh ion con với tỷ lệ ion xác định được, đáp ứng yêu cầu theo EC 657/2002.

3.1.2. Khảo sát điều kiện sắc ký

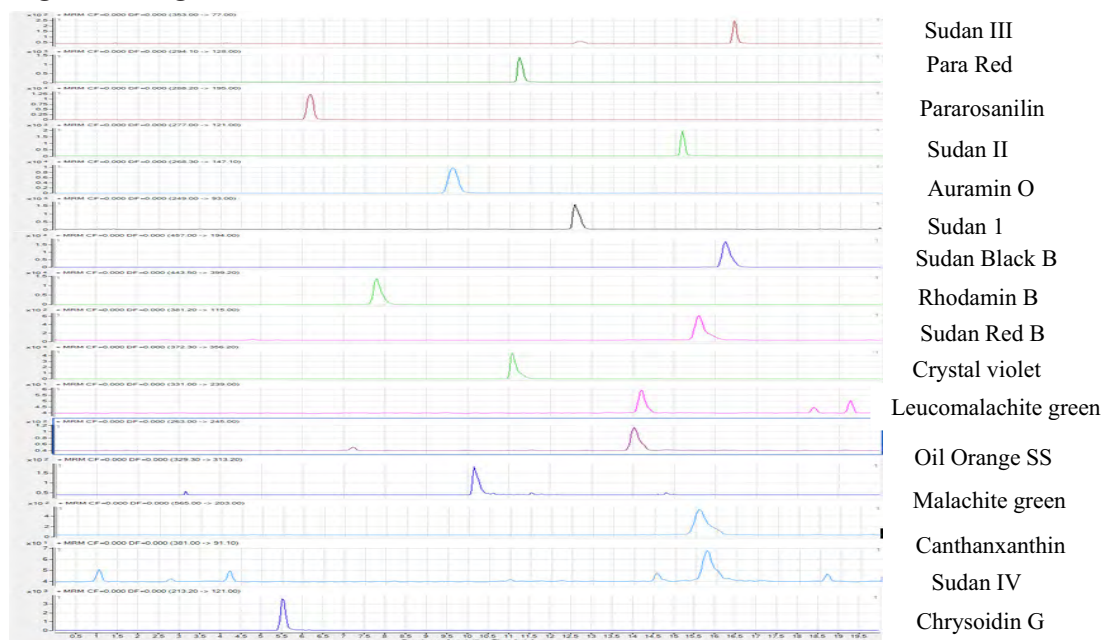
Các cột C18 của Waters gồm cột Symmetry (3,0 mm × 150 mm × 3,5 μm) và cột Acquity C18 (100 mm × 2,1 mm × 1,7 μm) đã được khảo sát để đánh giá khả năng tách các chất màu. Pha động được sử dụng là ACN và acid formic 0,1%. Kết quả cho thấy, sử dụng cột Acquity C18 (100 mm × 2,1 mm × 1,7 μm) cho pic tách tốt hơn, cỡ hạt nhỏ phù hợp cho hệ U-HPLC của Agilent. Do đó, cột Acquity C18 (100 mm × 2,1 mm × 1,7 μm) được sử dụng trong nghiên cứu này.

Gradient pha động gồm 2 kênh acetonitril và acid formic 0,1% được khảo sát để tối ưu, tốc độ dòng 0,4 mL/phút, thể tích tiêm 10 μL. Kết quả điều kiện gradient tối ưu được thể hiện trong bảng 2.

Bảng 2. Điều kiện gradient pha động để phân tích các chất màu trong nghiên cứu

Thời gian (phút)	ACN (%)	Acid formic 0,1%
1	20	80
8	70	30
12	70	30
12	90	10
15	90	10
15,01	20	80
20	20	80

Với điều kiện LC đã khảo sát, các pic sắc ký được phân tích khỏi nền mẫu và phân tách với nhau do sự khác nhau về mảnh phổ. Hình 1 giới thiệu sắc đồ hỗn hợp chuẩn các chất màu có nồng độ 100 ng/mL.



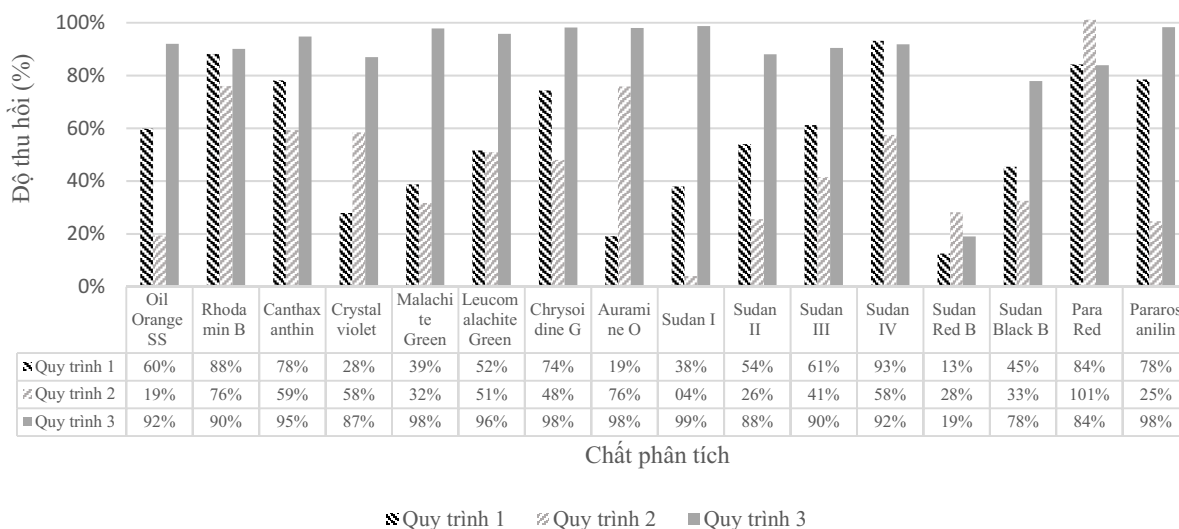
Hình 1. Sắc đồ hỗn hợp chuẩn các chất màu có nồng độ 100 ng/mL

3.1.3. Khảo sát quy trình xử lý mẫu

Các thử nghiệm được thực hiện trên mẫu trắng đã được thêm chuẩn sau khi cân mẫu. Nồng độ thêm chuẩn trên dịch cuối là 100 µg/L cho tất cả các chất.

3.1.3.1. Lựa chọn quy trình xử lý mẫu

Tiến hành phân tích trên thiết bị LC-MS/MS các mẫu dịch thu được từ 03 quy trình xử lý mẫu ở mục 2.3.1. Đánh giá độ thu hồi của các chất ở mỗi quy trình xử lý mẫu. Kết quả nghiên cứu các phương pháp xử lý mẫu phân tích được trình bày ở hình 2.



Hình 2. So sánh độ thu hồi chất phân tích của 3 phương pháp xử lý mẫu

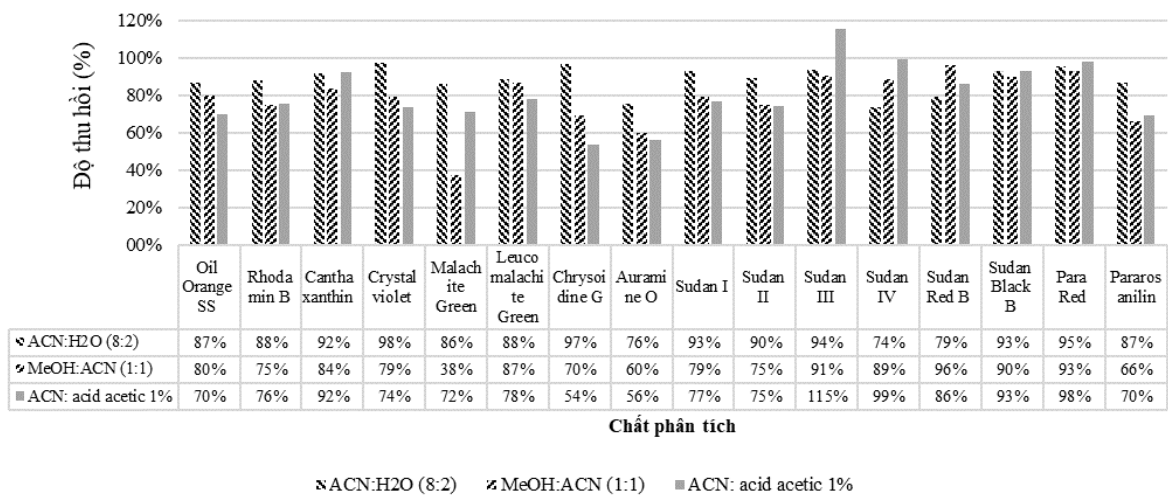
Kết quả phân tích cho thấy, quy trình 3 (QuEChERS) cho tính hiệu chất phân tích của 16 chất đều cao hơn so với quy trình 1 và 2. Điều này đồng nghĩa với việc phương pháp QuEChERS cho hiệu suất cao hơn so với phương pháp sử dụng cột SPE và cột SPE HLB. Nguyên nhân có thể do tính chọn lọc của các cột chiết pha rắn đã rửa một số chất phân tích có ái lực kém và lưu giữ quá chặt với các chất có ái lực mạnh. Các chất phân tích có tính chất hóa lý khá đa dạng: Rhodamine B, sudan black, para red, pararosanilin,... tan tốt trong methanol; sudan I, sudan II, sudan III, sudan IV tan tốt trong acetone; crystal violet tan tốt trong nước, dẫn đến khó khăn trong việc xây dựng quy trình phân tích chung cho các chất. Cột Alumina-N phase ứng dụng tốt cho phân tích nhóm các chất tan trong dầu, do đó hiệu suất thu hồi của các chất oil orange SS, sudan I, sudan II, sudan III, sudan IV cao nhưng với các chất còn lại sẽ kém. Do đó, quy trình xử lý mẫu được lựa chọn dự kiến như sau:

- Cân 2 g mẫu vào ống ly tâm 50 mL.
- Thêm 10 mL dung môi chiết, lắc ngang 30 phút (khảo sát loại dung môi chiết).
- Thêm hỗn hợp muối chiết. Lắc vortex. Ly tâm 6000 vòng/phút (khảo sát loại muối chiết).
- Lấy 1 mL dịch vào ống làm sạch d-SPE. Lắc vortex. Ly tâm 12.000 vòng/phút (khảo sát chất hấp phụ sử dụng trong bước d-SPE).
- Lấy dịch chiết phân tích trên LC-MS/MS.

3.1.3.2. Khảo sát dung môi chiết

Ba hệ dung môi sau để khảo sát, bao gồm: ACN : H₂O (8 : 2), ACN : acid acetic 1%, MeOH : ACN (1 : 1). Mẫu sau khi cân được thêm chuẩn, để tủ lạnh qua đêm, sau đó được chiết

với 03 hệ dung môi trên. Ly tâm, lọc dịch qua màng lọc mẫu 0,2 µm và phân tích bằng thiết bị LC-MS/MS. Kết quả phân tích được trình bày ở hình 3.



Hình 3. Độ thu hồi các chất phân tích của các hệ dung môi

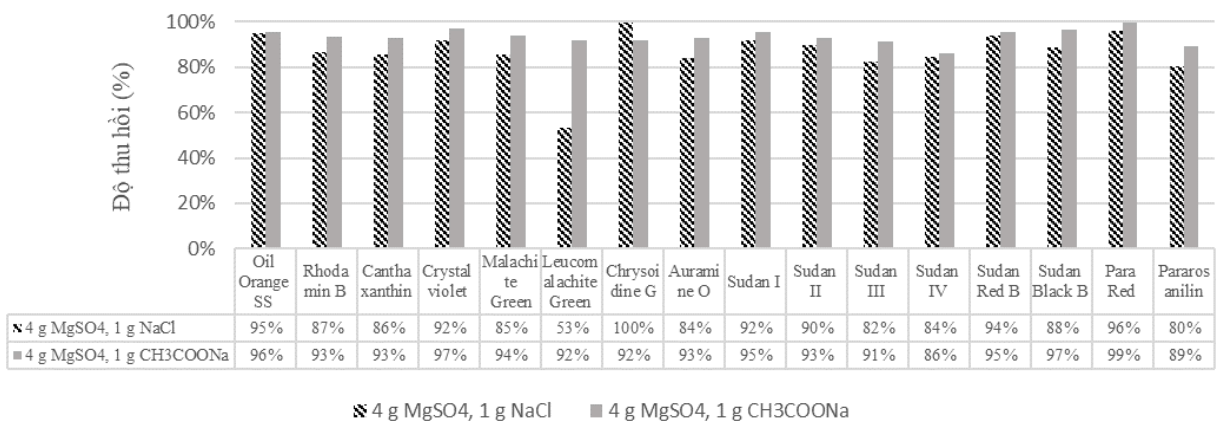
Từ kết quả thực nghiệm cho thấy, dung môi chiết ACN : H₂O (8 : 2) cho dịch chiết trong nhất. Kết quả phân tích trên thiết bị cho tín hiệu của các chất phân tích khi sử dụng dung môi chiết này cũng là cao nhất. Việc sử dụng ACN để làm dung môi chiết cũng rất tốt khi nó vừa có khả năng hòa tan các chất ưa dầu và các chất ưa nước đồng thời giúp loại bỏ một phần các protein và đường thường có trong các mẫu thực phẩm. Do đó, dung môi chiết ACN : H₂O (8 : 2) đã được lựa chọn cho các khảo sát tiếp theo.

3.1.3.3. Khảo sát muối chiết

Hai hệ muối chiết đã được khảo sát bao gồm:

- Hỗn hợp muối chiết 1: 4 g MgSO₄, 1 g NaCl
- Hỗn hợp muối chiết 2 : 4 g MgSO₄, 1 g CH₃COONa

Mẫu sau khi cân và thêm chuẩn, được chiết với 10 mL ACN : H₂O (8 : 2). Lắc ngang 30 phút. Thêm hỗn hợp muối chiết 1 và 2. Lắc vortex. Ly tâm, lọc dịch và phân tích trên thiết bị LC-MS/MS. Kết quả được trình bày ở hình 4.



Hình 4. Độ thu hồi các chất phân tích khi sử dụng các muối chiết khác nhau

Kết quả cho thấy việc dùng hỗn hợp muối MgSO₄ và CH₃COONa cho kết quả thu hồi của chất rhodamine B, sudan black B tốt hơn trong khi độ thu hồi của các chất khác cũng không

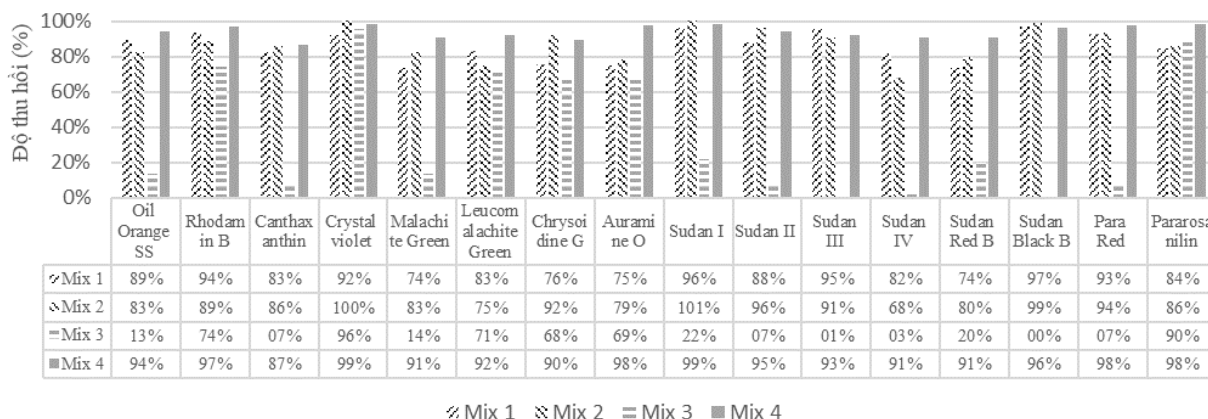
bị ảnh hưởng đáng kể, do đó hỗn hợp muối chiết này được chọn để khảo sát tiếp theo.

3.1.3.4. Khảo sát quá trình làm sạch dịch chiết d-SPE

Quá trình làm sạch dịch chiết bằng d-SPE đã được khảo sát sử dụng các hỗn hợp bột làm sạch sau:

- Mix 1: 0,12 g MgSO₄, 0,1 g C18
- Mix 2: 0,12 g MgSO₄, 0,1 g PSA
- Mix 3: 0,12 g MgSO₄, 0,1 g GCB
- Mix 4: 0,12 g MgSO₄, 0,05g PSA, 0,05 g C18

Kết quả khảo sát được trình bày trong hình 5.



Hình 5. Độ thu hồi các chất phân tích khi sử dụng các bột làm sạch khác nhau

Khi sử dụng GCB làm sạch dịch chiết, độ thu hồi của hầu hết các chất bị thấp đáng kể, đặc biệt là malachite green, sudan I, sudan 2, sudan 4, sudan red B, oil orange SS, sudan black B và para red. Trong khi đó, việc sử dụng kết hợp PSA và C18 cho hiệu suất của các chất cao hơn cả. PSA giúp loại bỏ đường và các acid hữu cơ còn lại trong mẫu. Việc sử dụng chất hấp phụ C18 giữ lại một lượng nhỏ lipid tránh cho mẫu bị nhiễm bẩn. Do đó, hỗn hợp 0,12 g MgSO₄, 0,05 g PSA, 0,05 g C18 đã được lựa chọn để làm sạch dịch chiết.

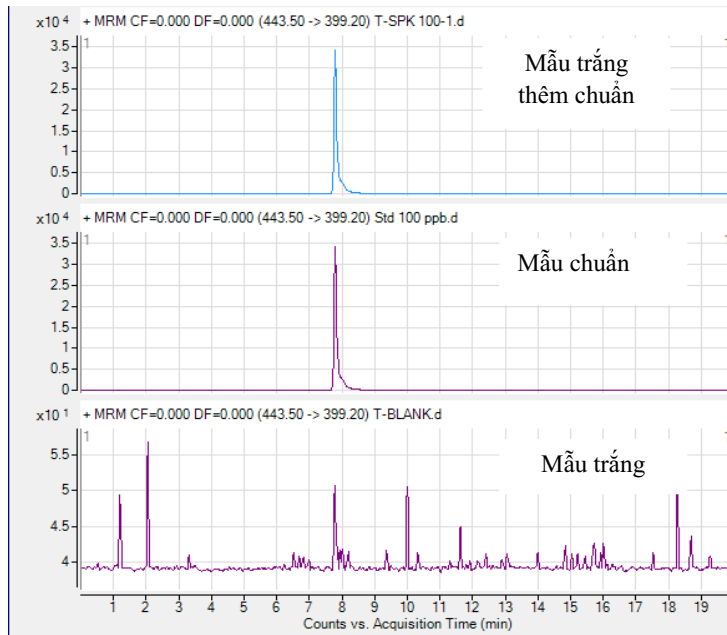
Quy trình xử lý mẫu tối ưu được lựa chọn như sau: Cân chính xác khoảng 2 g mẫu đã được đồng nhất vào ống ly tâm 15 mL. Thêm 10 mL ACN : H₂O (8 : 2), lắc vortex 1 phút, lắc ngang 30 phút. Thu lấy dịch sau ly tâm. Thêm 4 g MgSO₄, 1 g CH₃COONa, lắc vortex 1 phút, ly tâm lạnh 6000 vòng/phút trong 5 phút. Lấy 1 ml dịch vào ống d-SPE có chứa 0,12 MgSO₄, 0,05g PSA và 0,05 g C18, lắc vortex 1 phút, ly tâm 12.000 vòng/phút. Lọc qua màng lọc mẫu cỡ 0,2 μm rồi khi tiến hành phân tích trên LC-MS/MS.

3.2. Thẩm định phương pháp phân tích

3.2.1. Tính đặc hiệu

Tiến hành phân tích mẫu trắng (mẫu thịt bò khô đã được xác là không chứa các chất màu nghiên cứu), mẫu chuẩn và mẫu trắng thêm chuẩn hỗn hợp các chất màu với nồng độ 100 μg/kg.

Trên sắc ký đồ ở hình 6, mẫu trắng không có tín hiệu các chất màu trong nghiên cứu, mẫu trắng thêm chuẩn có các pic hoàn toàn phù hợp về thời gian lưu so với các pic tương ứng trên sắc ký đồ mẫu chuẩn các chất màu. Có tối thiểu 4 điểm nhận dạng, tương đương với 1 ion mẹ và 2 ion con, ngoài ra, tỷ lệ ion của mẫu thêm chuẩn phù hợp với tỷ lệ ion trên sắc ký đồ mẫu chuẩn tương ứng thỏa mãn các tiêu chí theo tiêu chuẩn EC 657/2002 của châu Âu. Các kết quả cho thấy phương pháp đáp ứng yêu cầu về tính đặc hiệu, có thể xác định được sự có mặt các chất màu trộn trái phép trong mẫu thực phẩm.



Hình 6. Sắc đồ mẫu trắng, mẫu chuẩn, mẫu thêm chuẩn Rhodamin B của thịt bò khô

3.2.2. Kết quả thẩm định phương pháp

Tiến hành thẩm định phương pháp theo AOAC các tiêu chí: Giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng, đường chuẩn, khoảng tuyến tính, độ đúng. Kết quả được thể hiện ở bảng 3.

Bảng 3. Tổng hợp kết quả thẩm định phương pháp

TT	Tên chất	Khoảng tuyến tính (µg/L)	LOD (µg/kg)	LOQ (µg/kg)	Độ thu hồi (R %)	Độ lặp lại (RSD %)
1.	Oil Orange SS	10 - 1000	50	150	80 - 92	2,5 - 15
2.	Rhodamin B	1,0 - 500	5,0	15	85 - 90	2,4 - 10,1
3.	Canthaxanthin	10 - 1000	50	150	84 - 101	3,5 - 11,0
4.	Crystal violet	1,0 - 500	5,0	15	73 - 104	0,4 - 11,9
5.	Malachite green	10 - 1000	50	150	90 - 103	3,2 - 12,2
6.	Leucomalachite green	10 - 1000	50	150	87 - 95	0,7 - 11
7.	Chrysoidin G	1,0 - 500	5,0	15	86 - 98	2,4 - 10,4
8.	Auramin O	1,0 - 500	5,0	15	83 - 104	2,3 - 11,1
9.	Sudan I	10 - 1000	50	150	87 - 103	3,7 - 11,3
10.	Sudan II	10 - 1000	50	150	91 - 103	4,6 - 16,4
11.	Sudan III	10 - 1000	50	150	77 - 90	3,1 - 10,3
12.	Sudan IV	10 - 1000	50	150	82 - 98	2,6 - 11,1
13.	Sudan Red B	10 - 1000	50	150	76 - 100	3,5 - 11,3
14.	Sudan Black B	10 - 1000	5,0	15	78 - 96	2,9 - 11,5
15.	Para Red	1,0 - 500	50	150	86 - 98	3,3 - 10,3
16.	Pararosanilin	1,0 - 500	5,0	15	97 - 98	6,3 - 10,8

Theo kết quả trên, khoảng tuyến tính của các chất khá rộng, dao động trong khoảng từ 1 - 500 $\mu\text{g/L}$ đối với rhodamin B, crystal violet, chrysoidin G, auramin O, para red, pararosanilin và 10 - 1000 $\mu\text{g/L}$ với các phẩm màu còn lại. Giới hạn phát hiện LOD từ 5,0 - 50 $\mu\text{g/kg}$, độ thu hồi tốt từ 73 - 104% nằm trong khoảng cho phép (70 - 110%), độ lặp lại $\text{RSD} \leq 16,4\%$ đạt yêu cầu theo yêu cầu của AOAC về đánh giá tiêu chí độ lặp ($< 21\%$).

3.3. Ứng dụng phương pháp xác định các chất màu trộn trái phép trong thực phẩm

Áp dụng quy trình xử lý mẫu và phân tích bằng LC-MS/MS đã được khảo sát và thẩm định để phân tích sàng lọc một số mẫu được lấy ngẫu nhiên trên thị trường. Nhóm nghiên cứu đã áp dụng phương pháp trên để phân tích 30 mẫu thịt bò khô, thịt gà khô, tương ớt, ớt bột, chất phụ gia tạo màu. Phát hiện 02 mẫu gồm ớt bột và 04 mẫu phụ gia tạo màu chứa phẩm màu không trong danh mục cho phép của Bộ Y tế rhodamin B với mức hàm lượng là 215 $\mu\text{g/kg}$, 6112 $\mu\text{g/kg}$, 1010 $\mu\text{g/kg}$, 480 $\mu\text{g/kg}$, 12,5 mg/kg , 150 mg/kg , sudan I với hàm lượng 420 $\mu\text{g/kg}$ và auramin O là 5 mg/kg .

4. KẾT LUẬN

Quy trình xác định 16 chất màu không nằm trong danh mục cho phép của Bộ Y tế quy định bằng phương pháp sắc ký lỏng khối phổ hai lần đã được xây dựng và thẩm định. Kết quả thẩm định cho thấy phương pháp có độ đặc hiệu đạt yêu cầu, LOD đủ thấp để phát hiện các chất màu trộn lẫn trong thực phẩm, độ lặp lại và độ thu hồi đáp ứng yêu cầu theo AOAC. Kết quả ứng dụng phương pháp để xác định 16 chất màu trên các nền mẫu thịt bò khô, thịt gà khô, tương ớt, ớt bột cho thấy phương pháp đã bước đầu phát hiện đồng thời các chất màu trộn trái phép trong thực phẩm.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Nguyễn Hùng Long, Lâm Quốc Hùng và cộng sự, “Đặc điểm vệ sinh môi trường và vệ sinh an toàn thực phẩm ở một số cơ sở sản xuất, chế biến thực phẩm năm 2007”, *Kỷ yếu hội nghị khoa học An toàn thực phẩm lần thứ 5- 2007*, Hà Nội: Nhà xuất bản Y học, 2007.
- [2] Y. L. Wu, C. Li, X. Xia, Y.J. Liu and J. Z. Shen (2003), “Development and validation of a confirmatory HPLC method for simultaneous determination of Sudan Dyes in animal tissues and eggs”, *Journal of Chromatographic Science*, vol. 48, no.1, pp. 63-67, 2010.
- [3] Chi cục an toàn vệ sinh thực phẩm TP. Hồ Chí Minh. *Thông tin cảnh báo chất Auramin O trên măng tươi, măng khô*, 2016
- [4] X. He, Y. Chen, H. Li, T. Zou, M. Huang, H. Li and E. Xia, “Analysis of sudan I in food by QuEChERS combined with ultrasound - assisted dispersive liquid-liquid microextraction with solidification of floating organic drop (UADLLME-SFO) prior to HPLC-PAD”, *Food Science and Technology Research*, vol. 21, no. 5, pp. 659-664, 2015.
- [5] J. Li, X.M. Ding, D.D. Liu, F. Guo, Y. Chen, Y. B. Zhang, H. M. Liu, “Simultaneous determination of eight illegal dyes in chili products by liquid chromatography-tandem mass spectrometry”, *Journal of Chromatography B*, vol. 942-943, pp. 46-52, 2013.
- [6] F. Feng, Y. Zhaoa, W. Yonga, L. Suna, G. Jiang, X. Chu, “Highly sensitive and accurate screening of 40 dyes in soft drinks by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry”, *Journal of Chromatography B*, vol. 879, pp. 1813-1818, 2011.
- [7] R. Liu, W. Hei, P. He, Z. Li, “Simultaneous determination of fifteen illegal dyes in animal feeds and poultry products by ultra-high performance liquid chromatography tandem mass Spectrometry”, *Journal of Chromatography B*, vol. 879, pp. 2416-2422, 2011.
- [8] Z. Hu, P. Qi, N. Wang, Q. Q. Zhou, Z. H. Lin, Y. Z. Chen, X. W. Mao, J. J. Jiang, C. Li, “Si-

multaneous determination of multiclass illegal dyes with different acidic-basic properties in foodstuffs by LC-MS/MS via polarity switching mode”, *Food Chemistry*, vol. 309, pp. 71-133, 2018.

- [8] W. Jia, X. Chu, Y. Ling, J. Huang, Y. Lin, J. Chang, “Simultaneous determination of dyes in wines by HPLC coupled to quadrupole orbitrap mass spectrometry”, *Journal of Separation Science*, vol. 37, no.7, pp. 782-791, 2014.
- [9] D. Pagáčiková and J. Lehotay, “Determination of synthetic colours in meat products using high-performance liquid chromatography with photodiode array detector”, *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, vol. 38, pp. 579-583, 2014.

Summary

SIMULTANEOUS DETERMINATION OF SIXTEEN ILLEGAL DYES IN FOODSTUFFS BY LIQUID CHROMATOGRAPHY TANDEM MASS SPECTROMETRY

Vu Lan Phuong^{1*}, Nguyen Thi Ha Binh², Doan Thu Huyen¹
Le Thi Kim Van³, Tran Cao Son², Le Thi Hong Hao²

¹ Hanoi University of Pharmacy

² National Institute for Food Control

³ National Institute of Medicinal Materials

A liquid chromatography tandem mass spectrometry method using positive electrospray ionization source (ESI+), multiple reaction monitoring (MRM) mode has been developed and validated to simultaneously determine 16 illegal dyes in different food groups. The method was based on the extraction of analytes from samples using QuEChERS technique. After being cleaned up d-SPE tube with mixture of MgSO₄, PSA and C18 sorbent, the extract was analyzed by LC-MS/MS. Each illegal dye was characterized by a precursor ion and two product ions. The method allows the screening of the simultaneous presence of 16 illegal substances at the lowest concentration of 5 µg/kg for rhodamin B, crystal violet, chrysoidine G, auramine O, sudan black B, pararosanilin and of 50 µg/kg for remaining substances. The specificity of the method met 657/2002/EC requirements. The method was linear in the range from 1 - 1000 µg/L and the method detection limit was from 5 - 50 µg/kg, the recovery ranged from 73 - 104% and the relative standard deviations were lower than 16.4%. The method has been applied to analyze 30 samples of dried beef, dry chicken, chutney, chili powder and food coloring samples. Rhodamine B, sudan I and auramine O were detected in two chili powder and 04 food coloring samples.

Keywords: LC-MS/MS, illegal dyes, foodstuffs, dried beef, dried chicken, food colour.